

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) PI 9906202-0 A



(22) Data de Depósito: 10/12/1999
(43) Data de Publicação: 11/09/2001
(RPI 1601)

(51) Int. Cl⁷.:
A01N 43/90

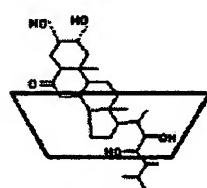
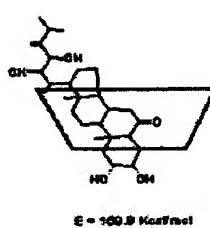
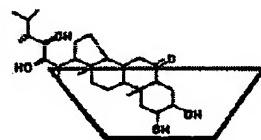
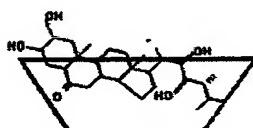
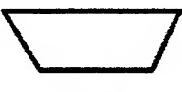
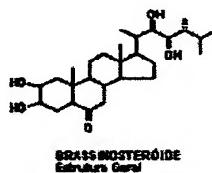


(54) Título: **PROCESSO DE FORMULAÇÃO DE CICLODEXTRINA/BRASSINOSTERÓIDES, PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA, UTILIZADOS COMO HORMÔNIOS VEGETAIS**

(71) Depositante(s): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp (BR/SP)

(72) Inventor(es): Nélon Eduardo Durán Caballero, Joel Bernabe Alderete Trivinos, Terezinha de Jesus Garcia Salva, Mariangela de Burgos Martins de Azevedo, Marco Antonio Teixeira Zullo

(74) Procurador: Octacílio Machado Ribeiro



“PROCESSO DE FORMULAÇÃO DE CICLODEXTRINA / BRASSINOSTERÓIDES, PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA, UTILIZADOS COMO HORMÔNIOS VEGETAIS”

Refere-se o presente relatório à formulação de complexos de ciclodextrinas e brassinosteróides, visando à sua aplicação agrícola, como hormônios vegetais.

5 α , β e γ -Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos consistindo de 6, 7 e 8 unidades de glicose e podem ser obtidas em larga escala a partir do amido. As CD formam complexos de inclusão com pequenas moléculas que se inserem em suas cavidades, que têm tamanho variável entre 5 e 8 Å (Fig.1). Estes complexos são de interesse para a pesquisa científica porque eles existem em soluções aquosas e
10 podem ser usados para o estudo de interações hidrofóbicas, muito importantes em sistemas biológicos. Nos últimos 25 anos muitos artigos de revisão têm sido publicados a respeito dos complexos de inclusão que as CD formam com outras moléculas modificando suas propriedades (Mandelcorn, *Non-stoichiometric compounds*, Academic Press, N.Y., 1964; Mifune e col., *J. Synth. Org. Chem. Jap.*
15 **35**, 116 (1977)).

Por outro lado os Brassinosteróides são uma nova e ampla classe de hormônios vegetais (Fig.2) que mostram acentuada atividade promotora do crescimento vegetal (Grove e col., *Nature*, **281**, 216 (1979)), no incremento da fertilidade, no acréscimo do rendimento da colheita, e no aumento da resistência a estresses abióticos (Ikekawa e col., *Practical Applications of 24-Epibrassinolide in Agriculture*, em H. G. Cutler, T. Yokota & G. Adam (eds.), *Brassinosteroids, Chemistry, Bioactivity & Applications*, American Chemical Society (ACS Symposium Series no. 474), ch. 24, pp. 281 (1991); Vázquez e col., *Brasinoesteroides, nuevos reguladores del crecimiento vegetal*, Ediciones INCA, Cuba, 63 pp., (1998); Kamuro e col., *Practical Application of Brassinosteroids in Agriculture*, em A. Sakurai, T. Yokota & S. D. Clouse (eds.), *Brassinosteroids - Steroidal Plant Hormones*, Springer, Tokyo, ch. 10, pp. 223, (1999); Khripach e col., *Pratical applications and toxicology*, em *Brassinosteroids, a new class of plant hormones*, Academic Press, ch. 11, pp. 325, (1999)). Os resultados dos estudos realizados até o momento mostram sua importância agrícola e nos levam a testar sua potencialidade quando associados a ciclodextrinas.
20
25
30

Tendo como objetivo aumentar a eficiência destes hormônios vegetais em testes frente a culturas de arroz, feijão alface, café, alho, videira, algodão e floríferas,

e com isso conseguir-se melhorar os resultados em suas atividades biológicas, esta invenção relata a formulação de brassinosteróides com as ciclodextrinas.

A mais importante propriedade dos compostos de inclusão é que o componente hospedeiro pode admitir o hóspede no interior de sua cavidade sem que nenhuma ligação covalente seja formada (Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 344 (1980)). Outra vantagem na utilização das ciclodextrinas como complexos de substâncias ativas biologicamente, é que elas não apresentam toxicidade (French, *Adv. Carbohydr. Chem.* 12, 189 (1957)) e seu metabolismo de degradação é comparável ao do amido, como mostrado com estudos em ratos (Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 344 (1980)). Outros estudos também comprovaram que a administração oral de CD é inofensiva de acordo com relatórios da FAO.

Estudos teóricos visando a verificar se o tamanho molecular de 24-epibrassinolídeo seria compatível com o diâmetro da cavidade das CD foram realizados. Utilizou-se o programa de *AM1* de *GAMESS* e se verificou que a inclusão do fitomônio na β -ciclodextrina era perfeitamente possível. Pelas estruturas analisadas neste estudo pôde-se demonstrar a inserção de 24-epibrassinolídeo na CD. Resultados obtidos dos cálculos da mecânica molecular mostraram que a conformação mais estável, ou seja a de mais baixa energia, $E = 154,9$ Kcal/mol, foi encontrada quando o brassinosteróide está inserido na cavidade da β -CD pela sua cadeia lateral de maneira axial, análoga ao complexo da Fig. 3. Resultados similares foram obtidos com α - e γ -CDs e para os brassinosteróides 28-norbrassinolídeo, 28-homobrassinolídeo, 24-epicastasterona, 28-norcastasterona e 28-homocastasterona.

Utilizando as técnicas de difração de raios-X (DRX), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN) foi possível confirmar a incorporação dos solutos através das medidas observadas. O estudo de DRX apresentou sinais característicos em $2\theta = 34^\circ$ e 39.5° para o 24-epibrassinolídeo puro, e o espectro do complexo com β -CD mostrou o desaparecimento completo destes sinais e o aparecimento de um pico cristalino em $2\theta = 23.5^\circ$, sendo estas alterações indicativas da formação do complexo de inclusão. Pela técnica de DSC aplicada à interação de ciclodextrinas com substâncias biologicamente ativas (Connors, *Chem. Rev.* 97, 1325 (1997); Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 344 (1980)) encontraram-se resultados similares aos obtidos por DRX. A curva de DSC do 24-epibrassinolídeo mostra uma endotérmica em

100.88° C, correspondente à perda de uma molécula de água de cristalização, e em 250.58° C, correspondente ao início da fusão do esteróide. A curva derivada do complexo de inclusão mostra uma forte endotérmica em 114.67° C, atribuída à β-CD, e em 250.58° C ocorre o desaparecimento da endotérmica correspondente à fusão do 24-epibrassinolídeo. Desta maneira, através da análise dos resultados obtidos, pode-se também verificar a formação dos vários complexos dos fitormônios citados com as α- e γ-CDs.

Uma vez demonstrada a formulação dos complexos CD/brassinosteróides, os estudos biológicos foram realizados com esta nova formulação de CD/brassinosteróides nas proporções 1:1 e 2:1.

Os ensaios biológicos da inclinação da lâmina de arroz (Wada e col. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 719, (1984)) com os vários complexos permitiram observar a melhoria da performance quando os fitormônios estão encapsulados com as CD.

REIVINDICAÇÕES

- 1. "PROCESSO DE FORMULAÇÃO DE CICLODEXTRINA / BRASSINOSTERÓIDES, PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA, UTILIZADOS COMO HORMÔNIOS VEGETAIS",** caracterizados por formulação de ciclodextrinas;brassinosteróides (α -, β - e γ -ciclodextrinas) permitindo grande aumento de atividade e efeitos biológicos mais significativos. As proporções realizadas para os complexos de inserção foram 1:1 e 2:1.
- 2. "PROCESSO DE FORMULAÇÃO DE CICLODEXTRINA / BRASSINOSTERÓIDES, PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA, UTILIZADOS COMO HORMÔNIOS VEGETAIS",** caracterizado por ensaios biológicos da inclinação da lâmina de arroz, medidas do complexo de inserção ciclodextrinas;brassinolídeos nas diferentes proporções.

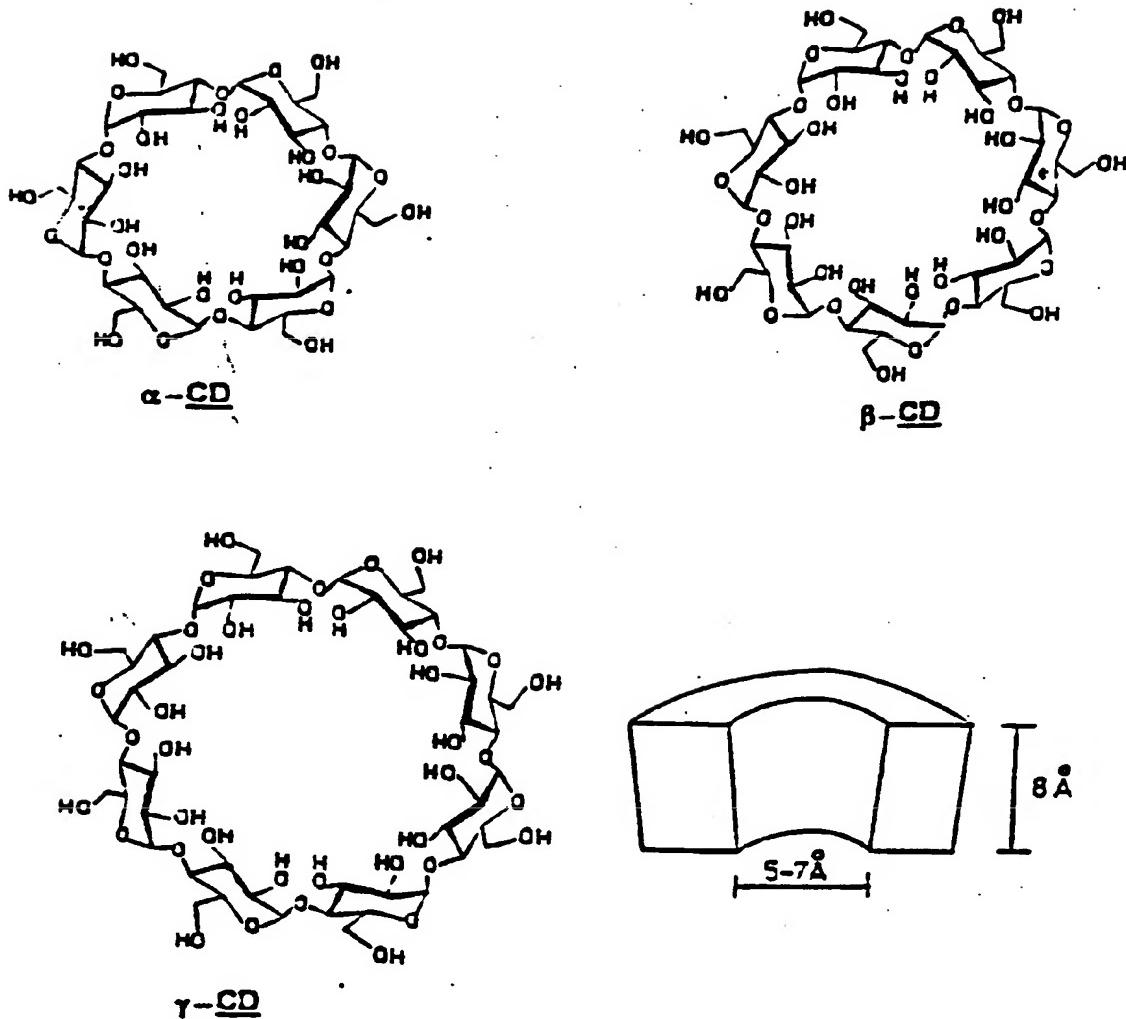


FIGURA 01

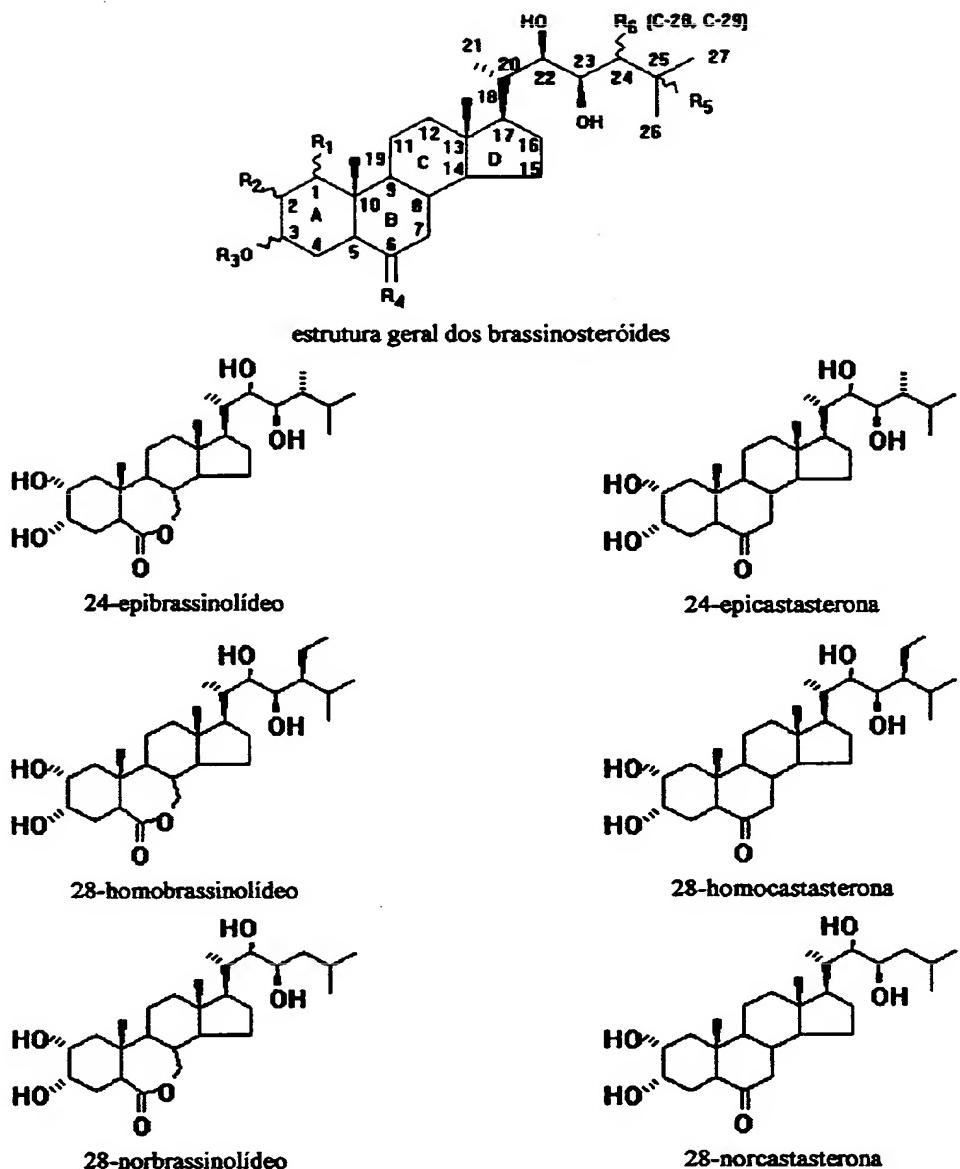
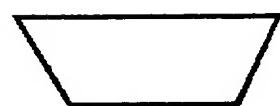
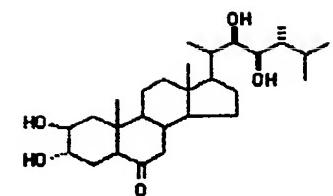


FIGURA 02



• CICLODEXTRINA

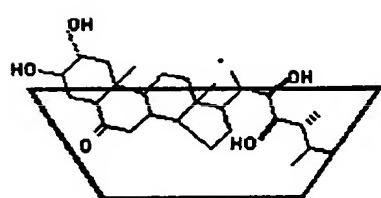
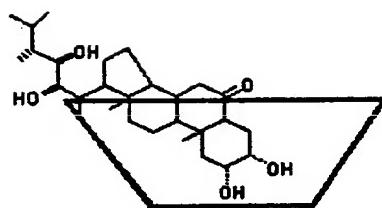
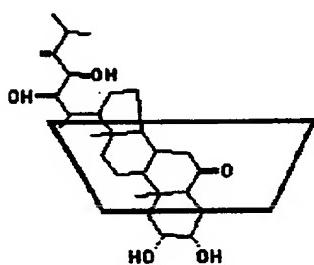
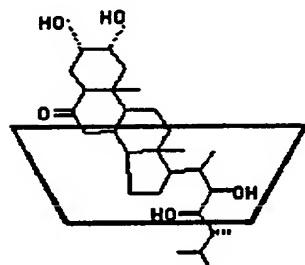
 $E = 154.9 \text{ Kcal/mol}$
Equatorial A $E = 160.9 \text{ Kcal/mol}$
Equatorial B $E = 159.8 \text{ Kcal/mol}$
Axial A $E = 158.9 \text{ Kcal/mol}$
Axial B

FIGURA 03

RESUMO

"PROCESSO DE FORMULAÇÃO DE CICLODEXTRINA/BRASSINOSTERÓIDES, PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA, UTILIZADOS COMO HORMÔNIOS VEGETAIS".

A presente invenção refere-se a uma metodologia para formulação de ciclodextrina;brassinosteróides em várias proporções aumentando a performance dos fitormônios para sua utilização como promotores de crescimento vegetal bem como aumento no rendimento de sementes, incremento da fertilidade e o aumento da resistência a estresse abióticos.

Os estudos feitos nesta invenção com os complexos de inserção da ciclodextrina;brassinosteróides mostraram sua grande aplicabilidade em medidas do acréscimo do rendimento da colheita.